

IN-VITRO-RESISTENZSTEIGERUNGSVERSUCHE
MIT CEFTIZOXIM UND PENICILLIN G
BEI NEISSERIA GONORRHOEAE

HANS BEHRENDT

1986

*Diss
München*

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München
Direktor: Prof.Dr.Dr.h.c.O.Braun-Falco

In-Vitro-Resistenzsteigerungsversuche
mit Ceftizoxim und Penicillin G bei
Neisseria gonorrhoeae.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans Behrendt

.....

aus

Bad Tölz

.....

Jahr

1986

.....

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:....Prof.Dr.Dr.h.c.D.Braun-Falco

Mitberichterstatter:..Prof.Dr.G.Ruckdeschel.....

Dekan:.....Prof.Dr.W.Spann.....

Tag der mündlichen Prüfung:..29.April.1986.....

Ich danke hiermit Herrn Prof.Dr.Dr.h.c.O.Braun-Falco für die Überlassung des Themas dieser Dissertation.

Herrn Dr.U.Neubert, Leiter des Bakteriologischen Labors der Klinik, danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Besonderen Dank schulde ich Herrn OA Dr.H.C. Korting für die Hilfestellung bei der praktischen Durchführung der Dissertation.

Nicht zuletzt gehört mein Dank den Medizinisch-technischen Assistentinnen Fr.Bergen, Fr.Raith und Fr.Eberth für die Unterstützung bei der technischen Durchführung der Versuche.

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS.

1.	Einleitung.....	1
2.	Material und Methoden.....	5
2.1.	Material.....	5
2.2.	Methoden.....	7
2.2.1.	Der Versuchsablauf.....	10
2.2.2.	Statistische Testverfahren.....	15
3.	Ergebnisse.....	16
3.1.	Resistenzentwicklung bei Penicillin G als Bezugssubstanz.....	16
3.2.	Resistenzentwicklung bei Ceftizoxim.....	22
3.3.	Kreuzresistenz der Penicillin-exponierten Gonokokkenstämme.....	27
3.4.	Kreuzresistenz der Ceftizoxim-exponierten Gonokokkenstämme.....	31
3.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	34
4.	Diskussion.....	36
4.1.	Allgemeines zum Problem der Bakterien- resistenz.....	36
4.2.	Untersuchungsmethoden zur Überprüfung des Resistenzsteigerungspotentials.....	39

4.3. Resistenzsteigerung bei Gonokokken in Gegenwart verschiedener Antibiotika.....	43
5. Zusammenfassung.....	46
6. Literaturverzeichnis.....	48
Erklärung.....	52
Lebenslauf.....	53

1.EINLEITUNG

Die Behandlung der Gonorrhoe mit Sulfonamiden Mitte der 30iger Jahre unseres Jahrhunderts bedeutete zunächst einen größeren therapeutischen Fortschritt (Felke, 1938). So dauerte die Behandlung nicht mehr - wie davor üblich - durchschnittlich 60 Tage, sondern die Krankheit heilte in 80% der Fälle innerhalb von 3 Tagen aus (Felke, 1947). Allerdings erwiesen sich die Sulfonamid-Verbindungen schon nach rund fünf Jahren als nicht mehr wirkungsvoll: die Gonokokken wurden resistent gegen Sulfonamide. In diesem Zusammenhang spielt die p-Aminobenzoesäure eine Rolle, wie Kimmig 1943 zeigen konnte.

Eine therapeutische Alternative wurde damals im Streptomycin gesehen; aber auch dieses Antibiotikum wurde nach breiterer Anwendung rasch unwirksam. In diesem Zusammenhang erscheint es wichtig, daß das hohe Resistenzpotential von Streptomycin bei *Neisseria gonorrhoeae* aufgrund von Untersuchungen *in vitro* bereits im Jahr 1946 (Miller, Bohnhoff) - also schon vor seiner breiteren Anwendung - aufgezeigt worden

war.

Ein auf Jahrzehnte hinaus bedeutender Durchbruch in der Chemotherapie der Gonorrhoe stellte demgegenüber das ebenfalls in den 40iger Jahren eingeführte Penicillin dar, das sich immer mehr zum Medikament der Wahl entwickelte. Obwohl schon früh auch beim Penicillin das Auftreten resistenter Gonokokkenstämme vermutet wurde (Felke, 1947), ließ sich dieser Verdacht erst gegen Ende der 50iger Jahre erstmals erhärten (Röckl, 1959).

Dieser langsamen Resistenzentwicklung der Gonokokken gegenüber Penicillin und der schnellen Resistenzentwicklung der Gonokokken gegenüber Streptomycin liegen zwei unterschiedliche Resistenzmechanismen zugrunde, die man zunächst bei *E.coli* und *Staph.aur.* untersucht hat (Demerec, 1948). So kann zwischen einem Mehrschritt-Resistenztyp ("multi-step-pattern", Penicillin-Typ) und einem Einschnitt-Resistenztyp ("one-step-pattern", Streptomycin-Typ) unterschieden werden. Derartige Versuche schienen geeignet, eine Voraussage bezüglich der langfristigen Einsetzbarkeit eines Antibiotikums zu treffen. Und angesichts dieses Mehrschritt-Resistenzmechanismus steigerte sich denn auch die chromosomale Resistenz von *Neisseria gonorrhoeae* so langsam, daß dieses Antibiotikum

(Penicillin) zumindest erfolgreich bei der Gonorrhoe eingesetzt werden konnte (Petzoldt, 1976).

Vor einigen Jahren trat aber zu dem sich nur langsam entwickelnden Problem der chromosomalen Resistenz ein weiteres hinzu: manche Gonokokkenstämme wiesen nunmehr ein Plasmid auf, welches die Bildung einer β -Lactamase codiert, die Penicillin zu spalten vermag (Phillips, 1976). Angesichts dieser Tatsache boten sich die neuen, β -Lactamase-stabilen Cephalosporine als Alternative für die Behandlung der Gonorrhoe an. Aufgrund zahlreicher Untersuchungen *in vitro* (Khan, 1981; Sng, 1982; Korting, 1984) und *in vivo* (Korting, Neubert, 1984) darf ihre hohe Wirksamkeit und Verträglichkeit bei der Gonorrhoe bereits als gesichert gelten.

Vor einer breiten Einführung in die Therapie stellt sich aber - nicht zuletzt vor dem Hintergrund der leidvollen Erfahrung mit Streptomycin - noch die Frage nach dem Resistenzsteigerungspotential der neueren Cephalosporine. Dabei gilt es insbesondere zu wissen, ob bei ihnen eine Resistenzsteigerung vom Einschnitt- oder Mehrschritt-Resistenztyp zu erwarten ist.

Um dieser Fragestellung am Beispiel des Ceftizoxims nachzugehen, soll in der vorliegenden Untersuchung

das Resistenzverhalten von Gonokokkenstämmen untersucht werden, die wiederholt gegenüber diesem Antibiotikum - wie auch zu Vergleichszwecken gegenüber Penicillin - in vitro exponiert werden.

Im Prinzip soll dabei auf das Verfahren von Marcuse und Hussels (1954) zurückgegriffen werden, das diese Autoren erfolgreich bei Penicillin eingesetzt haben.

2. MATERIAL UND METHODEN.

2.1. Material.

Die in den Versuchen verwendeten fünf Neisseria-gonorrhoeae-Stämme stammen von Urethralabstrichen männlicher Patienten mit unkomplizierter, nicht vorbehandelter Gonorrhoe. Dabei wurden die Stämme aus einer Vielzahl von zur Verfügung stehenden Gonokokken, deren MHK-Werte (Werte der Minimalen Hemmkonzentration) gegenüber Penicillin in Vorversuchen bestimmt wurden, so ausgewählt, daß sie in ihrer Empfindlichkeit im Hinblick auf die Bezugssubstanz, eben Penicillin, eine Streuung aufweisen (Tab.1).

Nr. des N.go.-Stammes	MHK ($\mu\text{g/ml}$)
7022/81	0,016
8646/81	0,016
9088/81	0,064
9520/81	0,256
1039/82	1,0

Tab.1. Empfindlichkeit der Neisseria-gonorrhoeae-Stämme gegenüber Penicillin.

Zur Qualitätskontrolle wird als 6. Stamm der Gonokokken-Referenzstamm III der WHO verwendet. Alle genannten Stämme bilden keine β -Lactamase. Das Kollektiv besteht also aus zwei gegenüber Penicillin relativ empfindlichen Stämmen, zwei resistenten und einem, dessen MHK-Wert ungefähr in der Mitte liegt.

Identifiziert und charakterisiert werden die Gonokokken über:

- die Kolonienmorphologie,
- die Gram-Färbung,
- die Methylenblau-Färbung,
- die typische Zuckervergärung (nach Meyer-Rohn, 1958),
- den Oxidase-Test,
- den Nitrocefin-Test, um β -Lactamase-Bildung auszuschließen (O'Callaghan, 1972).

Diese Tests werden auch während des Passagierens in regelmäßigen Abständen durchgeführt.

2.2.Methoden.

Die Bestimmung der Empfindlichkeit der Gonokokken gegenüber den verschiedenen Antibiotika wird durchgeführt mittels des Agar-Dilutions-Verfahrens (Korting, Neubert, 1984). Für diesen Testagar werden verwendet Difco-Bacto-Proteose Nr.3 Agar, dehydrated (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA), IsovitaleX Enrichment (BBL, Cockeysville, Md., USA) und Dried Bovine Hemoglobin (BBL, Cockeysville, Md., USA).

An Antibiotika werden verwendet für die Hauptversuche Penicillin-G-Na (Grünenthal; Ch.-B. 2 G 1706) und Cefprozim (Boehringer, Mannheim; Ch.-B. 813764 A), zur Bestimmung der Kreuzresistenz Streptomycin (Grünenthal; Ch.-B. 62), Spectinomycin (Upjohn; Ch.-B. 81 A 105), Cefotiam (Grünenthal; Ch.-B. 2 D 1006), Tetracyclin (Cyanamide; Ch.-B. A 530062), Cefotetan (ICI-Pharma; Ch.-B. 51274/82) und Rifampicin (Grünenthal; Ch.-B. 4 K 1896).

Um die einzelnen Antibiotika dem Agar zugeben zu können, werden sie mit Ausnahme des Rifampicins in Aq.dest. gelöst und Verdünnungsreihen hergestellt; Rifampicin wird nicht in Aq.dest., sondern in Methanol gelöst. Bei Zugabe von jeweils 1 Teil Antibiotikum-Lösung zu 100 Teilen Agar-Lösung erhält man eine geometrische Verdünnungsreihe, deren Konzentrationen

sich jeweils um den Faktor 2 unterscheiden.

Zur Herstellung einer homogenen Aufschwemmung der Gonokokken wird als Lösungsmittel verwendet Trypticase Soy Broth mit 1%igem Zusatz von Isovitalex (beide von BBL, Cockeysville, Md., USA).

Die Gewinnung eines standardisierten Inoculums (die Gonokokken dazu stammen aus den antibiotikafreien Subkulturen, siehe 2.2.1.) von 10^4 KBE (= Kolonie-bil-dende Einheiten, auch als CFU = colony forming units bezeichnet) geschieht mithilfe eines Photometers (Spectronic 20, Bausch and Lomb, Chicago, Ill., USA) bei einer Wellenlänge von 500 nm und einer Extinktion von 0,25. (Anmerkung: Diese Extinktion, die von der üblichen von 0,15 abweicht, wird in einem Vorversuch experimentell ermittelt. Mithilfe der Ausspatelung von verschiedenen Verdünnungen der Gonokokken-Aufschwemmungen bei verschiedenen Extinktionen wird nachgewiesen, daß bei $E=0,15$ der Wert für KBE bzw. für CFU zwischen $0,2 \times 10^4/\mu\text{l}$ und $4,9 \times 10^4/\mu\text{l}$ schwankt; bei $E=0,25$ erhält man eine Streuung für KBE von $1 \times 10^4/\mu\text{l}$ bis $8 \times 10^4/\mu\text{l}$. Da nun die Keimzahl bei $E=0,25$ nicht unter $10^4/\mu\text{l}$ sinkt, wird diese Extinktion gewählt. Aufgrund der breiten Streuung der Werte läßt sich eine exakte Einstellung des Inoculums bei $KBE=10^4/\mu\text{l}$ nur näherungsweise erreichen.)

Die Überimpfung auf den Agar geschieht mit einem Denley-Multipoint-Inoculator (Mast Laboratories Ltd, Liverpool, England).

Die Bakterienkulturen werden üblicherweise bei 37°C und einer CO₂-Spannung von 5% über 22 h bebrütet. Zum Einfrieren und Konservieren der Gonokokken in flüssigem Stickstoff bei -80°C (Schockgefrierung) findet fetales Kälberserum Verwendung.

Für die Zuckervergärung (zur Identifikation der Gonokokken, siehe 2.1.) benötigt man CT-Agar (Cystine-Tryptase-Agar, Bio-Mérieux, Charbonnières-les-Bains, France); die drei verschiedenen Zucker sind jeweils in kleinen Plättchen enthalten, die auf den Agar aufgelegt werden (Gluc-Discs von Bio-Mérieux, Charbonnières-les-Bains, France).

2.2.1. Der Versuchsablauf.

Die einzelnen Versuchsschritte sind in einem Flußdiagramm veranschaulicht (Abb.1).

Das Prinzip des Versuchs besteht - wie schon in der Einleitung angedeutet - in der wiederholten Exposition von Gonokokken-Stämmen gegenüber den jeweiligen höchsten subminimalen Hemmkonzentrationen (=maximale subinhibitorische Konzentration).

Zu Beginn werden die MHK-Werte von allen fünf *Neisseria-gonorrhoeae*-Stämmen gegenüber allen Antibiotika bestimmt. Für die beiden Antibiotika, die miteinander verglichen werden sollen (Penicillin und Ceftizoxim) ist dies gleichzeitig die Passage 0 (1).

So werden nun nur die Bakterien weiterverarbeitet, die auf den Penicillin-haltigen bzw. Ceftizoxim-haltigen Nährböden angezüchtet worden sind. Die Bakterien werden jeweils nur einem Antibiotikum ausgesetzt, d.h. Penicillin-exponierte Gonokokken werden nur auf Penicillin-haltigen Nährböden weitergezüchtet, Ceftizoxim-exponierte Gonokokken werden nur auf Ceftizoxim-haltigen Nährböden weitergezüchtet. Erst am Schluß der Versuchsreihe werden die MHK-Werte gegenüber allen Antibiotika bestimmt.

Zur Anreicherung bzw. Materialgewinnung werden nun Subkulturen (Zwischenpassagen) auf antibiotikafreien

Nährböden zwischengeschaltet. Die Abimpfung erfolgt dazu zum einen von der Grenzwachstumsstufe, die als diejenige Antibiotika-Konzentration definiert ist, die gerade noch Bakterienwachstum erlaubt (die Minimale Hemmkonzentration ist folgegemäß die nächsthöhere Konzentrationsstufe), und zum anderen von der Stufe darunter (sog. submaximale Wachstumsstufe, nach Marcuse, Hussels, 1954), um bei Nichtanwachsen der Grenzwachstumsstufe jederzeit auf die darunterliegende Stufe, die dann die Grenzwachstumsstufe darstellt, zurückgreifen zu können (② im Diagramm).

Nach der üblichen Bebrütung von 22 h wird von den Subkulturen der maximalen Wachstumsstufe ein definiertes Inoculum (siehe oben) wiederum auf antibiotikahaltiges Nährmedium verimpft: 1. Passage (④). Material von allen Subkulturen wird eingefroren (③). Dieser Vorgang - Abimpfung der Gonokokken von antibiotikahaltigem auf antibiotikafreies Nährmedium als Subkulturen - wird insgesamt 25mal durchgeführt. Nach der letzten Beimpfung (25. Passage, (⑤)) werden wiederum über Anreicherung mithilfe von Subkulturen die nun (mehr oder weniger) resistenzgesteigerten Gonokokkenstämme aus der Penicillin- bzw. Cefprozim-Reihe allen zu Beginn verwendeten Antibiotika ausgesetzt und so die MHK-Werte nach dem Passagieren

bestimmt (Kreuzresistenz 1, (6)).

Nach der 25. Passage werden zusätzlich noch fünf Passagen auf antibiotikafreiem Nährmedium durchgeführt: die 1. bis 5. "Leerpassage" (7), um eine eventuelle Resistenzabnahme nach Abwesenheit der Antibiotika nachweisen zu können.

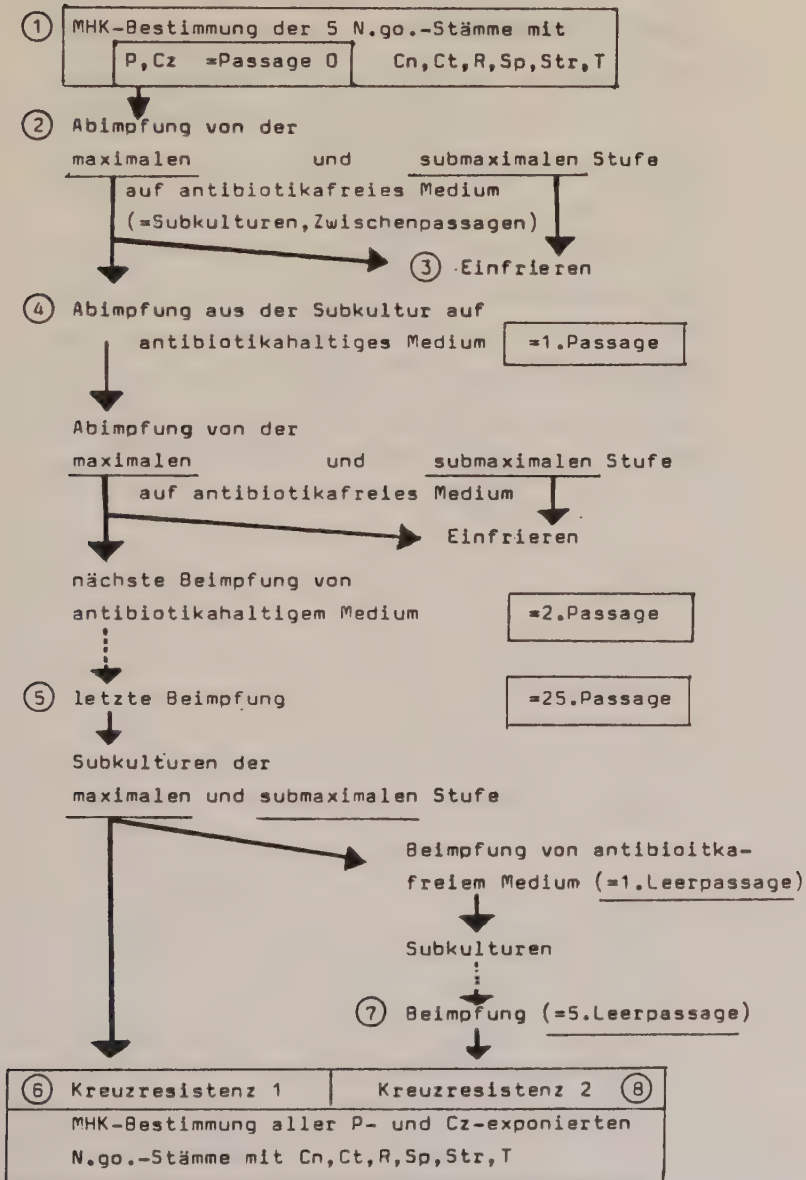
Nach der 5. Leerpassage werden dann noch einmal die MHK-Werte bei allen Antibiotika bestimmt (Kreuzresistenz 2, (8)).

Nicht im Schema enthalten sind die Kontrollgruppe und die Qualitätskontrolle.

Die Kontrollgruppe wird mitgeführt, um das Ausmaß aller nicht auf Antibiotika-Wirkung beruhenden Einflußgrößen im Rahmen des Versuchsablaufs erfassen zu können.

Zur Qualitätskontrolle für die einwandfreie Herstellung und der richtigen Beimpfung und Bebrütung des antibiotikahaltigen Mediums wird der Referenzstamm III der WHO mitgeführt (freundlicherweise vom WHO Reference Center, Kopenhagen, überlassen), der zu den Hauptpassagen immer neu verimpft wird und immer durch die gleiche Antibiotika-Konzentration im Wachstum gehemmt werden soll.

Abb.1. Schema des Versuchsablaufs.
(Abkürzungen siehe folgende Seite.)



Zu Abb.1 (vorhergehende Seite):

Verwendete Abkürzungen:

N.go.-Stamm	Neisseria-gonorrhoeae-Stamm
P	Penicillin
Cz	Ceftizoxim
Cn	Cefotetan
Ct	Cefotiam
R	Rifampicin
Sp	Spectinomycin
Str	Streptomycin
T	Tetracyclin
MHK	Minimale Hemmkonzentration

2.2.2.Statistische_Auswertungsverfahren.

Zur Bewertung etwaiger Unterschiede zwischen Vergleichsgruppen dient als statistisches Testverfahren der Wilcoxon-Test für unverbundene und verbundene Stichproben. Dieser parameterfreie Test wird gewählt, weil es sich bei vorliegender Untersuchung um kleine Stichprobenumfänge handelt. Zudem sind die Einzelwerte nicht normal verteilt (geometrische Reihe), so daß ein Test wie z.B. der Student-t-Test nicht angewendet werden kann.

Ebenso aus Gründen des kleinen Stichprobenumfangs wird nur auf einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,1$ geprüft.

3. ERGEBNISSE.

3.1. Resistenzentwicklung bei Penicillin G als Bezugssubstanz.

Die zeitliche Entwicklung der Empfindlichkeitsabnahme der Bakterien veranschaulicht Abb.2.

Nach der 25. Passage auf Penicillin-haltigem Schokoladenagar zeigen alle Neisseria-gonorrhoeae-Stämme eine Zunahme der MHK-Werte gegenüber den Ausgangswerten (MHK_0).

Diese relative Abnahme der Empfindlichkeit ist am größten bei den Stämmen mit niedriger AusgangsmHK (7022/81; 8646/81): Abnahme um je drei Konzentrationsstufen, am niedrigsten beim Stamm 1039/82 mit hohem Ausgangswert (Abnahme der Empfindlichkeit um eine Stufe).

Zwischen zwei aufeinander folgenden Passagen während des Versuchs beträgt der Anstieg auf höhere MHK-Werte höchstens zwei Stufen, so daß bei keinem der fünf Neisseria-gonorrhoeae-Stämme eine steile oder abrupte Zunahme der Resistenz (im Sinne des Einschritt-Resistenztyps) beobachtet werden kann. Im

Gegenteil: das Resistenzmuster - soweit man von Resistenz überhaupt sprechen kann - folgt dem Mehrschritt-Resistenztyp (multi-step-pattern). Bei Vergleich der MHK_0 -Werte und der MHK_{25} -Werte (Tab.2) zeigt sich eine signifikante Abnahme der Empfindlichkeit der *Neisseria-gonorrhoeae*-Stämme gegenüber Penicillin (geprüft durch den Wilcoxon-Test für paarige Stichproben bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,1$). Bei Vergleich der MHK_{25} -Werte mit den MHK_{25} -Werten der Kontrollgruppe (die, wie oben beschrieben, den gleichen Passagierungsprozeß durchlaufen hat, aber ohne Antibiotika-Zugabe) zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Sinne einer Abnahme der Empfindlichkeit (Wilcoxon-Test für unpaarige Stichproben; Tab.2). Das bedeutet aber, daß die oben gefundene Empfindlichkeitsabnahme wohl nicht allein auf die Einwirkung des Penicillins zurückzuführen ist.

Bei Vergleich der MHK_{25} -Werte mit den MHK -Werten, die nach fünf Leerpassagen gewonnen wurden, ergibt sich kein wesentlicher Unterschied im Sinne einer Empfindlichkeitszunahme nach Abwesenheit des Antibiotikums. Die über 25 Passagen erworbene Abnahme der Empfindlichkeit verliert sich also nach fünf Leerpassagen nicht (Tab.3).

Insgesamt muß betont werden, daß nach der 25. Passage die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber Penicillin zwar etwas abgenommen hat; von einer erworbenen "echten" Resistenz kann jedoch in keinem Fall gesprochen werden: Stamm 1039/82 mit dem höchsten MHK-Wert von 1,0 µg/ml ist immer noch nicht als Penicillin-resistent zu bezeichnen.

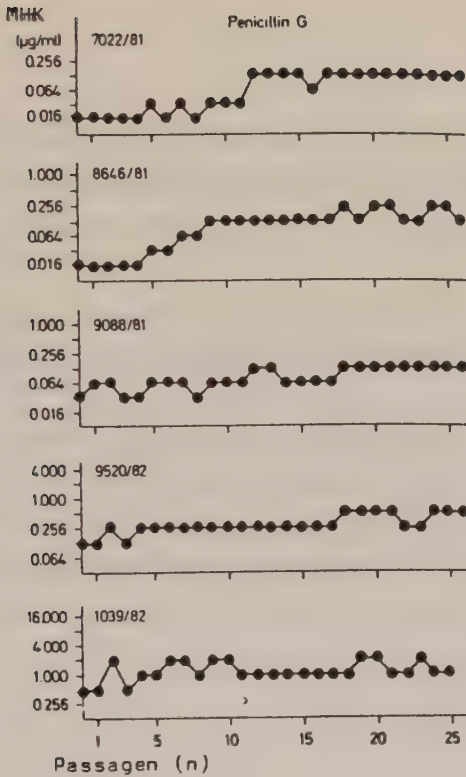


Abb.2. Zeitliche Entwicklung der Antibiotikum-Empfindlichkeit von *Neisseria gonorrhoeae* während wiederholter Exposition mit subinhibitorischen Penicillin-G-Konzentrationen.

Tab.2. MHK-Werte der fünf *Neisseria-gonorrhoeae*-Stämme vor (MHK₀; Ausgangswerte) und nach wiederholtem Passagieren (MHK₂₅) auf Penicillin-haltigem Nährmedium.

MHK-Werte der Kontrollstämme (MHK_{K25}) nach wiederholtem Passagieren auf hemmstoffreiem Nährmedium.

Stämme	7022/81	8646/81	9088/81	9520/81	1039/82	MW ¹⁾
MHK ₀	0,016	0,016	0,032	0,128	0,5	0,055
MHK ₂₅	0,128	0,128	0,128	0,5	1,0	0,254
MHK _{K25}	0,128	0,128	0,032	0,256	0,5	0,146

¹⁾ MW: Geometrische Mittelwerte.

Alle Angaben in µg/ml.

Tab.3. MHK-Werte der fünf *Neisseria-gonorrhoeae*-
Stämme nach wiederholtem Passagieren auf Penicillin-
haltigem Nährmedium (MHK₂₅) und nach anschließenden
fünf Leerpassagen (MHK_{L5}).

Stämme	7022/81	8646/81	9088/81	9520/81	1039/82	MW ¹⁾
MHK ₂₅	0,128	0,128	0,128	0,5	1,0	0,254
MHK _{L5}	0,128	0,256	0,128	0,256	1,0	0,255

¹⁾ MW: Geometrische Mittelwerte.

Alle Angaben in µg/ml.

3.2. Resistenzentwicklung bei Ceftizoxim.

Abb.3 veranschaulicht die zeitliche Entwicklung der Empfindlichkeitsabnahme der Bakterien.

Nach der 25.Passage auf Ceftizoxim-haltigem Scho-koladenagar zeigen auch hier alle Neisseria-gonorrhoeae-Stämme eine Zunahme der MHK-Werte gegenüber den Ausgangswerten (MHK_0).

Die relative Abnahme der Empfindlichkeit ist nun hier (im Gegensatz zu Penicillin) am größten bei den Stämmen mit hoher Ausgangs-MHK (Stamm 9520/81: Abnahme um 7 Konzentrationsstufen; Stamm 9088/81 und Stamm 1039/82: Abnahme um je 4 Stufen).

Wie Abb.3 zeigt, ist nun die zeitliche Entwicklung der Resistenz der bei Penicillin wieder vergleichbar: zwischen zwei aufeinanderfolgenden Passagen beträgt der Anstieg auf höhere MHK-Werte (bzw. die Abnahme der Empfindlichkeit) auch hier höchstens zwei Konzentrationsstufen, so daß - wie bei Penicillin - bei keinem der fünf Neisseria-gonorrhoeae-Stämme eine sprunghafte Zunahme der Resistenz im Sinne des Einschritttyps (one-step-pattern) beobachtet werden kann. Das Resistenzmuster folgt auch hier dem Mehrschritttyp oder multi-step-pattern.

Bei Vergleich der MHK_0 -Werte und der MHK_{25} -Werte (Tab.4) zeigt sich eine signifikante Abnahme der Emp-

findlichkeit der Bakterien gegenüber Ceftizoxim (Wilcoxon-Test für paarige Stichproben; Irrtumswahrscheinlichkeit: $\alpha=0,1$).

Bei Vergleich der MHK_{25} -Werte mit den MHK_{25} -Werten der Kontrollgruppe wird jedoch kein signifikanter Unterschied in der Abnahme der Empfindlichkeit beobachtet (Tab.4).

Nach fünf Leerpässagen ergibt sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den MHK_{25} -Werten und den Werten nach den Leerpässagen (Tab.5).

Bei vergleichender Betrachtung der Abb.2 und Abb.3 erscheint es so, als sei die relative Abnahme der Empfindlichkeit bei Ceftizoxim stärker als bei Penicillin. Vergleicht man aber die absoluten Werte (MHK_{25}) bei beiden Antibiotika, so sind die Gonokokken gegenüber Ceftizoxim immer noch wesentlich empfindlicher (Mittelwert der MHK_{25} für Ceftizoxim: $0,014 \mu\text{g/ml}$; Tab.4) als gegenüber Penicillin (Mittelwert: $0,254 \mu\text{g/ml}$; Tab.2), so daß erst recht im Falle des Ceftizoxims nicht von einer "echten" Resistenzentwicklung gesprochen werden kann.

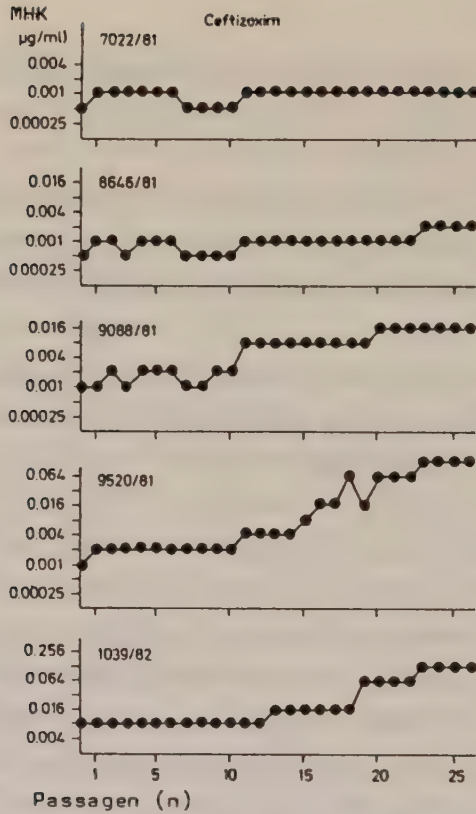


Abb.3. Zeitliche Entwicklung der Antibiotikum-Empfindlichkeit von *Neisseria gonorrhoeae* während wiederholter Exposition mit subinhibitorischen Ceftizoxim-Konzentrationen.

Tab.4. MHK-Werte der fünf *Neisseria-gonorrhoeae*-Stämme vor (MHK₀; Ausgangswerte) und nach wiederholtem Passagieren (MHK₂₅) auf Cefprozid-haltigem Nährmedium.

MHK-Werte der Kontrollstämmen (MHK_{K25}) nach wiederholtem Passagieren auf hemmstoffreiem Nährmedium.

Stämme	7022/81	8646/81	9088/81	9520/81	1039/82	MW ¹⁾
MHK ₀	0,0005	0,0005	0,001	0,001	0,008	0,001
MHK ₂₅	0,001	0,002	0,016	0,128	0,128	0,014
MHK _{K25}	0,004	0,004	0,002	0,004	0,008	0,004

¹⁾ MW: Geometrische Mittelwerte.

Alle Angaben in µg/ml.

Tab.5.MHK-Werte der fünf *Neisseria-gonorrhoeae*-
Stämme nach wiederholtem Passagieren auf Ceftrizoxim-
haltigem Nährmedium (MHK₂₅) und nach abschließenden
fünf Leerpässagen (MHK_{L5}).

Stämme	7022/81	8646/81	9088/81	9520/81	1039/82	MW ¹⁾
MHK ₂₅	0,001	0,002	0,016	0,128	0,128	0,014
MHK _{L5}	0,002	0,002	0,016	0,128	0,128	0,016

1) MW: Geometrische Mittelwerte.

Alle Angaben in µg/ml.

3.3. Kreuzresistenz der Penicillin-exponierten Gonokokkenstämme.

Die fünf *Neisseria-gonorrhoeae*-Stämme, die über 25 Passagen nur Penicillin ausgesetzt waren, werden zur Prüfung der Kreuzresistenz abschließend noch einmal allen Antibiotika exponiert (MHK_{25} , Tab. 6) und mit den Ausgangswerten verglichen (siehe auch Abb. 1, Kap. 2.2.1., Ziff. ⑥ im Flußdiagramm). Die dabei erhobenen Befunde sind in Tab. 6 niedergelegt, die zusätzlich zu Vergleichszwecken die Ausgangswerte wiedergibt.

Bei Vergleich der MHK_{25} -Werte und der MHK_K -Werte (Kontrollstämme) zeigt sich bei Streptomycin, Spectinomycin, aber auch bei Tetracyclin und Rifampicin eine Tendenz zur Zunahme der Empfindlichkeit, d.h. daß bei Penicillin-Exposition das Penicillin-Resistenzverhalten zum einen und das Resistenzverhalten der genannten vier Antibiotika zum anderen umgekehrt proportional zu sein scheint.

Bei den drei Cephalosporinen (Ceftizoxim - Cefotiam - Cefotetan) ergeben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den MHK_{25} -Werten und den MHK -Werten der Kontrollgruppe, so daß die Penicillin-Exposition keine Empfindlichkeitsabnahme bei den Cephalosporinen bewirkt.

Das Antibiotikum, das gegenüber den Penicillin-exponierten Gonokokkenstämmen die größte Wirksamkeit hat, ist das Cefprozim: der höchste MHK-Wert (Stamm 1039/82) beträgt 0,008 µg/ml.

Nach fünf Leerpässagen (MHK₅) ergeben sich bei allen sieben Antibiotika keine Unterschiede der MHK-Werte bezüglich MHK₂₅: die Empfindlichkeit der Gonokokken bleibt über fünf Pässagen stabil.

Tab.6.Kreuzresistenz Penicillin.MHK-Werte der fünf
Neisseria-gonorrhoeae-Stämme,die über 25 Passagen
nur Penicillin exponiert waren,gegenüber Strepto-
mycin,Spectinomycin,Tetracyclin,Rifampicin.

AB	Stämme	7022/81	8646/81	9088/81	9520/81	1039/82	MW ¹⁾
Str	MHK ₀	32,0	64,0	64,0	64,0	128,0	64,0
	MHK ₂₅	32,0	16,0	32,0	32,0	64,0	32,0
	MHK _{K25}	64,0	64,0	64,0	64,0	64,0	64,0
	MHK _{L5}	32,0	8,0	32,0	32,0	32,0	24,25
Sp	MHK ₀	32,0	32,0	64,0	64,0	64,0	48,50
	MHK ₂₅	32,0	16,0	32,0	32,0	32,0	27,86
	MHK _{K25}	64,0	64,0	64,0	64,0	64,0	64,0
	MHK _{L5}	32,0	8,0	32,0	32,0	32,0	24,25
T	MHK ₀	0,256	0,128	1,0	0,5	0,5	0,383
	MHK ₂₅	0,256	0,256	0,256	0,5	0,5	0,335
	MHK _{K25}	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,871
	MHK _{L5}	0,256	0,256	0,256	1,0	0,5	0,384
R	MHK ₀	0,032	0,128	0,256	0,128	0,5	0,146
	MHK ₂₅	0,016	0,016	0,016	0,256	0,5	0,055
	MHK _{K25}	0,256	0,256	0,256	0,256	1,0	0,336
	MHK _{L5}	0,016	0,016	0,016	0,256	0,5	0,055

¹⁾ MW: Geometrische Mittelwerte.

Alle Angaben in µg/ml.-Abkürzungen siehe folgende Seite.

Tab.6 (Forts.).Kreuzresistenz Penicillin.MHK-Werte
der fünf *Neisseria-gonorrhoeae*-Stämme,die über 25
Passagen nur Penicillin exponiert waren,gegenüber den
Cephalosporinen Ceftizoxim,Cefotiam,Cefotetan.

AB	Stämme	7022/81	8646/81	9088/81	9520/81	1039/82	MW ¹⁾
Cz	MHK ₀	0,0005	0,0005	0,001	0,001	0,008	0,001
	MHK ₂₅	0,002	0,004	0,002	0,004	0,008	0,003
	MHK _{K25}	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
	MHK _{L5}	0,002	0,004	0,002	0,004	0,008	0,003
Ct	MHK ₀	0,008	0,016	0,016	0,016	0,128	0,019
	MHK ₂₅	0,032	0,064	0,032	0,064	0,256	0,064
	MHK _{K25}	0,064	0,064	0,016	0,064	0,128	0,056
	MHK _{L5}	0,032	0,064	0,032	0,064	0,256	0,064
Cn	MHK ₀	0,032	0,032	0,064	0,128	1,0	0,097
	MHK ₂₅	0,128	0,256	0,128	0,5	0,5	0,254
	MHK _{K25}	0,256	0,256	0,064	0,256	1,0	0,255
	MHK _{L5}	0,128	0,256	0,128	0,5	1,0	0,291

¹⁾MW: Geometrische Mittelwerte.

Alle Angaben in µg/ml.

Abkürzungen:

AB	Antibiotikum	T	Tetracyclin	Cz	Ceftizoxim
Str	Streptomycin	R	Rifampicin	Ct	Cefotiam
Sp	Spectinomycin			Cn	Cefotetan

3.4. Kreuzresistenz der Ceftizoxim-exponierten Gonokokkenstämme.

Tab.7 gibt Auskunft über die Kreuzresistenz der Neisseria-gonorrhoeae-Stämme, die über 25 Passagen nur Ceftizoxim ausgesetzt waren.

Bei Vergleich der MHK_{25} -Werte mit den MHK -Werten der Kontrollgruppe (MHK_{K25}) kann bei keinem der 7 Antibiotika eine wesentliche Empfindlichkeitsabnahme oder Empfindlichkeitszunahme beobachtet werden.

Im Gegensatz zu den Penicillin-exponierten Stämmen besteht hier bei den Ceftizoxim-exponierten Stämmen demnach keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Rifampicin, Streptomycin, Spectinomycin und Tetracyclin. Wiederum bleiben die MHK -Werte nach fünf Leerpässagen (MHK_{L5}) in allen 7 Fällen stabil.

Tab.7.Kreuzresistenz Ceftizoxim.MHK-Werte der fünf
Neisseria-gonorrhoeae-Stämme,die über 25 Passagen
nur Ceftizoxim ausgesetzt waren gegenüber Strepto-
mycin,Spectinomycin,Tetracyclin,Rifampicin.

AB	Stämme	7022/81	8646/81	9088/81	9520/81	1039/82	MW ¹⁾
Str	MHK ₀	32,0	64,0	64,0	64,0	128,0	64,0
	MHK ₂₅	32,0	32,0	64,0	32,0	64,0	42,22
	MHK _{K25}	64,0	64,0	64,0	64,0	64,0	64,0
	MHK _{L5}	32,0	32,0	64,0	32,0	64,0	42,22
Sp	MHK ₀	32,0	32,0	64,0	64,0	64,0	48,50
	MHK ₂₅	64,0	32,0	64,0	64,0	64,0	55,72
	MHK _{K25}	64,0	64,0	64,0	64,0	64,0	64,0
	MHK _{L5}	32,0	32,0	64,0	64,0	64,0	48,50
T	MHK ₀	0,256	0,128	1,0	0,5	0,5	0,383
	MHK ₂₅	0,256	0,256	1,0	1,0	1,0	0,580
	MHK _{K25}	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,871
	MHK _{L5}	0,256	0,256	1,0	1,0	1,0	0,580
R	MHK ₀	0,032	0,128	0,256	0,128	0,5	0,146
	MHK ₂₅	0,256	0,128	2,0	0,256	0,256	0,336
	MHK _{K25}	0,256	0,256	0,256	0,256	1,0	0,336
	MHK _{L5}	0,256	0,256	2,0	0,256	0,256	0,386

1) MW: Geometrische Mittelwerte.

Alle Angaben in µg/ml.-Abkürzungen siehe folgende Seite.

Tab.7 (Forts.).Kreuzresistenz Ceftizoxim,MHK-Werte
 der fünf *Neisseria-gonorrhoeae*-Stämme,die über 25
 Passagen nur Ceftizoxim ausgesetzt waren,gegenüber
 Penicillin,Cefotiam,Cefotetan.

AB	Stämme	7022/81	8646/81	9088/81	9520/81	1039/82	MW ¹⁾
P	MHK ₀	0,016	0,016	0,032	0,128	0,5	0,055
	MHK ₂₅	0,016	0,016	2,0	0,256	0,128	0,111
	MHK _{K25}	0,128	0,128	0,128	0,5	1,0	0,254
	MHK _{L5}	0,016	0,032	2,0	0,128	0,128	0,111
Ct	MHK ₀	0,008	0,008	0,016	0,016	0,128	0,019
	MHK ₂₅	0,016	0,032	0,128	0,064	0,128	0,056
	MHK _{K25}	0,064	0,064	0,016	0,064	0,128	0,056
	MHK _{L5}	0,016	0,016	0,256	0,064	0,064	0,048
Cn	MHK ₀	0,032	0,032	0,064	0,128	1,0	0,097
	MHK ₂₅	0,064	0,064	1,0	0,256	0,5	0,221
	MHK _{K25}	0,256	0,256	0,064	0,256	1,0	0,255
	MHK _{L5}	0,064	0,064	1,0	0,256	0,256	0,193

¹⁾ MW: Geometrische Mittelwerte.

Alle Angaben in µg/ml.

Abkürzungen:

AB	Antibiotikum	T	Tetracyclin	P	Penicillin
Str	Streptomycin	R	Rifampicin	Ct	Cefotiam
Sp	Spectinomycin			Cn	Cefotetan

3.5.Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Die fünf *Neisseria-gonorrhoeae*-Stämme zeigen nach der 25. Passage auf Penicillin-G-haltigen bzw. auf Ceftizoxim-haltigen Nährböden keine Resistenz gegenüber diesen beiden Antibiotika.
2. Die beobachtete geringfügige Abnahme der Empfindlichkeit (bei Vergleich von MHK_0 und MHK_{25}) bei beiden Antibiotika erfolgt stufenweise nach dem Mehrschritt-Resistenztyp. Eine gewisse Empfindlichkeitsabnahme ist auch bei der Kontrollgruppe zu beobachten.
3. Die relative Abnahme der Empfindlichkeit erscheint beim Ceftizoxim zwar größer; die absoluten MHK -Werte weisen jedoch nach der 25. Passage noch eine relativ hohe Sensibilität gegenüber Ceftizoxim aus (höchster MHK -Wert bei Stamm 1039/82 und bei Stamm 9520/81: 0,128 $\mu g/ml$).
4. Die eingetretene Abnahme der Empfindlichkeit bleibt bei beiden Antibiotika über fünf Leerpässagen stabil.
5. Bei Prüfung der Kreuzresistenz zeigt sich bei den Penicillin-exponierten Stämmen eine zunehmende Empfindlichkeit gegen Tetracyclin, Rifampicin, Streptomycin und Spectinomycin. Bei den Cephalosporinen (insbesondere auch beim Ceftizoxim) ergibt sich kei-

ne offensichtliche Tendenz der Empfindlichkeits-
abnahme oder -zunahme. Das Antibiotikum, das gegen
die Penicillin-exponierten Stämme die größte Wir-
kung zeigt, ist das Ceftizoxim.

6. Bei Prüfung der Kreuzresistenz zeigt sich bei den
Ceftizoxim-exponierten Stämmen weder eine eindeu-
tige Abnahme noch Zunahme der Empfindlichkeit ge-
genüber allen anderen Antibiotika.

4. DISKUSSION.

4.1. Allgemeines zum Problem der Gonokokkenresistenz.

Eines der zentralen Probleme in der antibiotischen Therapie ist die Entwicklung einer Bakterienresistenz. Sie liegt immer dann vor, wenn trotz im besten Falle beim Menschen erreichbarer Antibiotikakonzentrationen noch Bakterienwachstum nachweisbar ist (Simon, Stille, 1982). Diese Autoren unterscheiden zwischen vier Resistenzarten:

- der natürlichen Resistenz, "die auf einer stets vorhandenen genetisch (chromosomal) bedingten Unempfindlichkeit einer Bakterienart gegen ein bestimmtes Antibiotikum beruht",
- der episomalen ("infektiösen") Resistenzübertragung durch Plasmide,
- der schon vor Behandlungsbeginn durch Mutation aufgetretenen primären Resistenz und
- der sekundären Resistenz als erst während der Therapie entstehender Unempfindlichkeit der Bakterien gegen ein Antibiotikum, welches letztere im vorliegenden Falle relevant erscheint.

Die Geschwindigkeit der Resistenzentwicklung ist unterschiedlich. Sie ist abhängig von der Mutationsfrequenz und vom betreffenden Antibiotikum. Die Mutationsfrequenz liegt im allgemeinen bei ca. 10^{-9} bis 10^{-10} (Drews, 1979). Der mögliche Einfluß des Antibiotikums zeigt sich besonders eindrucksvoll beim Streptomycin, bei dem die Resistenz sich während der Therapie sehr rasch entwickelt, was mit dem Ausdruck der Einschrittresistenz belegt wird ("one-step-pattern", Zinsser, 1960). Dieses von Demerec 1948 experimentell an *E. coli* und *Staph. aur.* festgestellte Resistenzmuster besitzt auch für Gonokokken Gültigkeit (Miller, Bohnhoff, 1946). Die beobachteten Therapieversager bei der Behandlung der Gonorrhoe lassen sich auf diese schnelle Form der Resistenzentwicklung zurückführen (Alergant, 1958).

Anders bei Penicillin. Das Resistenzverhalten ist gegenüber dem bei Streptomycin different: während einer breiten Anwendung von Penicillin tritt eine Resistenzentwicklung nur sehr langsam ein; diese Art der Bakterienresistenz führte zum Ausdruck Vielschrittresistenz ("multi-step-pattern", Zinsser, 1960). Anders als bei Streptomycin dauerte es drei Jahrzehnte, bis einige *Neisseria-gonorrhoeae*-Stämme eine totale chromosomale Resistenz gegen Penicillin ent-

wickelten (Shtibel,1980).Dies ein Beweis dafür,daß das in vitro gefundene Resistenzmuster des Penicillins mit den Beobachtungen in der Praxis übereinstimmt. So ist Penicillin heute bei unkomplizierter Gonorrhoe weithin noch Mittel der Wahl,obwohl man im Laufe der vergangenen vier Jahrzehnte der entsprechend langsamen Resistenzentwicklung bei diesem Antibiotikum mit stetig steigenden Penicillin-Dosen Rechnung tragen mußte:

So genügten in den Jahren 1945 - 1951 150 000 bis 200 000 IE Penicillin zur effektiven Gonorrhoe-Therapie,bis 1959 benötigte man 400 000 IE Penicillin, 1962 wurden 1 Mega IE Penicillin als ausreichend angesehen (Röckl,1962).

Heute gelten 4 Mega IE Penicillin als adäquate Therapie (Petzoldt,1976).

In Anbetracht des Auftretens β -Lactamase-produzierender Gonokokken (vgl. die Übersicht von Petzoldt, Gruender,1977) ist eine Alternative zum Penicillin nötig geworden,wie z.B. die neueren Cephalosporine, wovon das Ceftizoxim hier im Mittelpunkt der Betrachtung steht.

4.2. Untersuchungsmethoden zur Überprüfung des Resistenzsteigerungspotentials.

Vor einer breiten klinischen Anwendung von Ceftizoxim erscheint es aber notwendig, sein Resistenzsteigerungspotential bei Gonokokken in vitro zu untersuchen. Nur so kann geklärt werden, ob dieses Antibiotikum auch tatsächlich bei längerer breiter Anwendung eine potente Alternative zum Penicillin bleiben kann.

Vom Methodischen her bieten sich dazu die schon fast in Vergessenheit geratenen Resistenzsteigerungsversuche an, bei denen Bakterien wiederholt unterschiedlichen, in Sonderheit subinhibitorischen, Antibiotikakonzentrationen ausgesetzt werden, und zwar in der Form, daß stets diejenigen Bakterien weiterkultiviert werden, die bei der höchsten subinhibitorischen Konzentration gewachsen sind. Obwohl dieses Verfahren in der klinischen Bakteriologie nur sehr selten herangezogen wird, kann es jedoch als weithin akzeptiert gelten (Naumann, 1966).

Mit Gonokokken wurden derartige Resistenzsteigerungsversuche hauptsächlich in den vierziger Jahren durchgeführt, und zwar vor allem im Hinblick auf die Penicillin- und Streptomycin-Therapie. Freilich wurden die dabei angewandten Methoden oft nicht detailliert an-

gegeben. Nichtsdestotrotz ergab sich ein erstaunlich einheitliches Bild, und zwar von durchaus divergentem Charakter im Hinblick auf die beiden Antibiotika. Beim Penicillin fand man keine wesentliche Resistenzsteigerung, gleichgültig ob 7 (Marcuse, Hussels, 1954), 90 (Miller, Bohnhoff, 1945) oder 100 Passagen (Meyer-Rohn, 1958) durchgeführt wurden. Bei Parallelversuchen mit Streptomycin ließ sich hingegen eine rasche Resistenzentwicklung nachweisen: Miller und Bohnhoff (1945) benötigten für eine totale Streptomycin-Resistenz der Gonokokken nur 4-6 Passagen, was im Einklang steht mit den Beobachtungen von Demerec (1948), der eine Streptomycin-Resistenz von Staphylokokken ebenfalls schon nach einigen Passagen nachweisen konnte. Somit ist eine Resistenzentwicklung gemäß dem Einschnitt-Resistenztyp schon innerhalb der ersten zehn Passagen zu erwarten, d.h. die in vorliegender Untersuchung durchgeführte Passagenzahl von 25 erscheint als ausreichend, um eine Einschnitt-Resistenz insbesondere im Hinblick auf das Ceftizoxim nicht zu übersehen. Vergleichende Untersuchungen mit Rifampicin, das dem Streptomycin im Hinblick auf den Resistenztyp sehr ähnlich ist, bestätigen dies (Roth, 1984, persönliche Mitteilungen). Die hier gewählten antibiotikafreien Zwischenpassagen erscheinen beim

Arbeiten mit festen Medien unerlässlich, um stets eine hinreichend große, definierte Einsaat gewährleisten zu können. Miller und Bohnhoff (1945) bzw. Marcuse und Hussels (1954) verwendeten ebenfalls derartige Zwischenpassagen. Ihr damit verknüpfter Gedanke, durch die damit einhergehende Erholung der Gonokokken rascher eine Resistenzentwicklung beobachten zu können, muß heute freilich als zumindest fraglich erscheinen. Dies gilt im Übrigen auch für die ebenfalls von Miller und Bohnhoff (1945), aber auch von Murray (1946) vertretene Auffassung, feste Medien böten bei Resistenzsteigerungsversuchen insofern Vorteile, als sie ein besseres Wachstum als flüssige Medien ermöglichen könnten. Sicherlich sollte bei derartigen Resistenzsteigerungsversuchen die Bedeutung der Größe des Inoculums nicht unterschätzt werden. Steigt doch mit der Größe des Inoculums die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Mutanten als notwendig erscheinende Bedingung einer Resistenzentwicklung. Bislang wurden bei Resistenzsteigerungsversuchen mit Gonokokken dennoch keine Angaben zur Größe des Inoculums gemacht. In der vorliegenden Arbeit wurde demgegenüber als Inoculum dasjenige gewählt, welches bei Resistenzbestimmungen von Gonokokken im Agar-Dilutionstest üblicherweise bevorzugt wird, nämlich 10^4 Gonokokken/Impfpunkt. Beim vorliegen-

den Versuchsansatz ergibt sich damit über den Vorteil der Vereinheitlichung des Inoculums über alle Versuchsschritte hinweg stets die Möglichkeit, ohne weitere zusätzliche Versuchsschritte stets Kenntnis von der aktuellen Resistenzsituation der Stämme im Versuch zu haben. Um besserer Vergleichsmöglichkeiten willen sollte das hier gewählte Inoculum möglichst auch bei späteren analogen Untersuchungen gewählt werden.

4.3. Resistenzsteigerung bei Gonokokken in Gegenwart unterschiedlicher Antibiotika.

Die Resistenzentwicklung der Gonokokken folgt beim vorliegenden Versuchsansatz dem Mehrschrittyp (Zinsser, 1960): weder kommt es im Zusammenhang mit einer einzelnen Passage zu einem plötzlichen Anstieg der Resistenz um mehrere Stufen, noch werden insgesamt wirklich hohe Minimale Hemmkonzentrationen erreicht; liegt der höchste MHK-Wert nach der 25. Passage (bei Stamm 1039/82) doch bei 1,0 µg/ml, einem Wert, bei dem man noch nicht von einer völligen Penicillin-Resistenz sprechen kann (Rodriguez, 1975).

Daß die gefundenen Erhöhungen der MHK-Werte aber im wesentlichen tatsächlich auf die Einwirkung des Penicillins zurückgehen, zeigt der völlig andere Resistenzverlauf in der Kontrollgruppe mit seinem überaus diskreten Resistenzanstieg. Immerhin verdeutlicht dieser kleine Resistenzanstieg in der Kontrollgruppe aber doch deren prinzipielle Notwendigkeit, die bei früheren entsprechenden Untersuchungen anscheinend noch nie gesehen worden war. In diesem Zusammenhang gilt es auch auf die Stabilität des einmal erreichten Resistenzniveaus hinzuweisen, wie sie sich bei wiederholter Subkultivierung der Gonokokken in Abwesenheit irgendwelcher Antibiotika ausprägt. Dieser Befund steht im üb-

rigen im Einklang mit den Beobachtungen von Miller und Bohnhoff (1945).

Das Resistenzverhalten der Gonokokken bei wiederholter Exposition gegenüber Ceftizoxim entspricht im wesentlichen dem in Gegenwart von Penicillin. Wiederum läßt sich der Mehrschrittyp der Resistenzsteigerung erkennen. Damit verhalten sich die Gonokokken gegenüber diesem Cephalosporin in vitro so, wie es von anderen gramnegativen resp. grampositiven Keimen in Bezug auf die Cephalosporine dem Kliniker geläufig ist (Walter, Heilmeyer, 1975).

Bei dem direkten Vergleich von Ceftizoxim und Penicillin gilt es festzuhalten, daß auch am Ende der 25 Passagen alle eingesetzten *Neisseria-gonorrhoeae*-Stämme, die wiederholt gegenüber Ceftizoxim exponiert worden waren, gegenüber diesem Antibiotikum als hochempfindlich zu bezeichnen waren; lag der höchste terminale MHK-Wert doch bei 0,128 µg/ml (bei Stamm 1039/82 und bei Stamm 9520/81). Angesichts der guten Übereinstimmung zwischen den experimentellen und klinischen Befunden in Bezug auf die Resistenzsteigerung der Gonokokken gegenüber Penicillin, ebenfalls einem β -Lactam-Antibiotikum, erscheint es erlaubt, aus den vorliegenden Daten für Ceftizoxim den Schluß zu ziehen, daß auch bei breiter klinischer Anwendung in der Indikation

Gonorrhoe höchstens sehr langsam, d.h. binnen Jahrzehnten, mit dem Auftreten von Resistenzproblemen zu rechnen ist.

Daß bei Prüfung der Kreuzresistenz der Penicillin-exponierten Stämme die Empfindlichkeitsabnahme bei Penicillin korreliert ist mit einer Empfindlichkeitszunahme bei Tetracyclin, steht im Widerspruch zu den bisherigen Beobachtungen (Maness, 1973; WHO Scientific Group, 1978). Die gleiche Korrelation besteht beim Rifampicin; beim Streptomycin findet sich eine negative Korrelation, was im Einklang mit den Beobachtungen von Reyn (1973) steht.

Anders als beim Penicillin ließ sich beim Ceftizoxim im Rahmen der wiederholten Exposition keine eindeutige gleichzeitige Veränderung der Empfindlichkeit gegenüber anderen Antibiotika beobachten. Ob dieser Feststellung größere praktische Bedeutung zukommt, muß erst in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG.

Das wiederholte Subkultivieren von *Neisseria gonorrhoeae* in Gegenwart von subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen hat sich als brauchbare Methode *in vitro* erwiesen, um die geringe Potenz für eine Resistenzentwicklung gegen das β -Lactam-Antibiotikum Penicillin aufzudecken. Diese Methode wird nun auf Ceftizoxim angewendet, um vor einer breiten Anwendung dieses Antibiotikums eine Voraussage bezüglich einer langfristigen Einsetzbarkeit treffen zu können. Dazu werden fünf *Neisseria-gonorrhoeae*-Stämme unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber Penicillin wiederholt subinhibitorischen Konzentrationen von Ceftizoxim und Penicillin (als Bezugssubstanz) auf Schokoladenagar ausgesetzt. Die Weiterverimpfung geschieht immer von der Grenzwachstumsstufe aus und wird insgesamt 25mal durchgeführt. Nach diesen 25 Passagen hat die Empfindlichkeit der Gonokokken gegen Ceftizoxim und Penicillin gleichermaßen etwas abgenommen, eine partielle oder gar totale Resistenz gegen die beiden Antibiotika ist in keinem der fünf Gonokokken-

stämme aufgetreten. Das Ceftizoxim hat also eine dem Penicillin vergleichbare Potenz hinsichtlich einer Resistenzentwicklung. Demzufolge ist ein schneller Wirksamkeitsverlust des Ceftizoxims in der Therapie der Gonorrhoe bei breiter Anwendung nicht zu befürchten.

6.LITERATURVERZEICHNIS.

- (1) Alergant, C.D.: Streptomycin resistant gonorrhea.
Br.J.vener.Dis.34: 36-41 (1958).
- (2) Demerec, M.: Origin of Bacterial Resistance to
Antibiotics. J.Bacteriol.56: 63-74 (1948).
- (3) Drews, J.: Grundlagen der Chemotherapie. S.211-
249 (Springer, Wien-New York 1979).
- (4) Felke, H.: Die Wirkung der Sulfonamidverbindungen
auf die Erreger der Gonorrhoe. Klin.Wochenschr.
17/1: 13-16 (1938).
- (5) Felke, H.: Der Gang der Chemoresistenz der Gono-
kokken von 1937 - 1944 und seine Ursachen.
Dermatol.Wochenschr.26/2: 106-110 (1947).
- (6) Khan, M.Y.; Siddiqui, Y.; Simpson, M.L.; Gruninger,
R.P.: Comparative In Vitro Activity of Cefmenoxime,
Cefotaxime, Cefuroxime, Cefoxitin, and Penicillin
Against *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob.Ag.
Chemother.20: 681-682 (1981).
- (7) Kimmig, J.: Die p-Aminobenzoessäure und die Wirkung
der Sulfonamide. Dermatol.Wochenschr.22/2: 31-34
(1943).

- (8) Korting, H.C.: Plasma and Skin Blister Fluid Levels of Cefotiam and Cefmenoxime after Single Intramuscular Application of 1 g in Gonorrhea. Chemotherapy 30: 277-284 (1984).
- (9) Korting, H.C.; Neubert, U.: Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to Ceftriaxime in vitro and in vivo. Chemotherapy: 30: 322-327 (1984).
- (10) Maness, M.J.; Sparling, P.F.: Multiple Antibiotic Resistance due to a Single Mutation in *Neisseria gonorrhoeae*. J. Inf. Dis. 128/3: 321-330 (1973).
- (11) Marcuse, K.; Hussels, H.: Zur Frage der Penicillinempfindlichkeit der Gonokokken. Dermatol. Wochenschr. 130: 1031-1044 (1954).
- (12) Meyer-Rohn, J.: Experimentelle Untersuchungen zur Antibiotika-Resistenz von *Neisseria gonorrhoeae*. Hautarzt 9: 81-84 (1958).
- (13) Miller, C.P.; Bohnhoff, M.: Studies on the Action of Penicillin. IV. Development of Penicillin Resistance by *Gonococcus*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 60: 354-356 (1945).
- (14) Miller, C.P.; Bohnhoff, M.: Streptomycin Resistance of *Gonococci* and *Meningococci*. J. Amer. Med. Ass. 23: 485-488 (1946).
- (15) Murray, R.; Kilham, L.; Wilcox, C.; Finland, M.: Development of Streptomycin Resistance of Gramnegative

- Bacilli in vitro and During Treatment, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 63: 470-474 (1946).
- (16) Naumann, P.: Bakteriologische und pharmakologische Eigenschaften der neuen Cephalosporin-Antibiotika, Arzneimittel-Forsch. 16: 818-825 (1966).
- (17) O'Callaghan, C.H.; Morris, A.; Kirby, S.M.; Shingler, A.H.: Novel Method for Detection of β -Lactamases by Using a Chromogenic Cephalosporin Substrate, Antimicrob. Ag. Chemother. 1: 283-288 (1972).
- (18) Petzoldt, D.: Die Einzelbehandlung der Gonorrhoe bei Mann und Frau. In: Braun-Falco, O.; Marghescu, S.: Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie. VIII. Band, S. 395-404 (Springer, Berlin 1976).
- (19) Petzoldt, D.; Gruender, K.: Penicillinase-bildende *Neisseria gonorrhoeae*, Hautarzt 28: 307-310 (1977).
- (20) Phillips, I.: Beta-Lactamase-Producing Penicillin-Resistant *Gonococcus*, Lancet ii: 656-657 (1976).
- (21) Reyn, A.; Schmidt, H.; Trier, M.; Bentzon, M.W.: Spectinomycin hydrochloride (Trobicin) in the Treatment of Gonorrhea, Br. J. vener. Dis. 49: 54-59 (1973).
- (22) Rodriguez, W.; Saz, A.K.: Possible Mechanism of Decreased Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to Penicillin, Antimicrob. Ag. Chemother. 6: 788-792

- (23) Röckl, H.: Nimmt die Penicillin-Empfindlichkeit der Gonokokken ab? Münch. Med. Wochenschr. 101: 708-711 (1959).
- (24) Röckl, H.: Welche therapeutischen Konsequenzen ergeben sich aus der abnehmenden Empfindlichkeit der Gonokokken? Münch. Med. Wochenschr. 25: 1169-1174 (1962).
- (25) Shtibel, R.: Non-beta-lactamase-producing *Neisseria gonorrhoeae* highly resistant to penicillin. Lancet ii: 39 (1980).
- (26) Simon, C.; Stille, W.: Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis. S. 8-10 (Schattauer, Stuttgart 1982).
- (27) Sng, E. H.; Rajan, V. S.; Pang, R.; Yeo, K. L.: Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to Cefotaxime and Ceftizoxime. Br. J. vener. Dis. 57: 162-164 (1981).
- (28) Walter, A. M.; Heilmeyer, L.: Antibiotika-Fibel. S. 25 (Thieme, Stuttgart 1975).
- (29) WHO Scientific Group: *Neisseria gonorrhoeae* and gonococcal infections. WHO Technical Report Series 616: 84-91 (1978).
- (30) Zinsser, H.: Microbiology. S. 91-96 (Appleton-Century-Crofts, New York 1960).

ERKLÄRUNG.

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation völlig selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmittel im Literaturverzeichnis angefertigt habe.

Dezember 1985

Hans Schmoll

LEBENS LAUF.

19. März 1959	Als Sohn von Hans Emil Behrendt und Elisabeth, geb. Kumpfmüller, in Bad Tölz geboren.
1965 - 1969	Besuch der Volksschule in Bad Tölz.
1969 - 1978	Besuch des Gymnasiums in Bad Tölz.
1978	Abitur.
WS 1978	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der LMU München.
März 1981	Ärztliche Vorprüfung.
Dezember 1982	Beginn der Dissertation an der Dermatologischen Universitätsklinik München.
Juni 1985	Ärztliche Prüfung und Approbation.
November 1985	Anstellung als Wissenschaftlicher Assistent am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU München.

